

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de médecine

FACULTE DE MEDECINE
Professeur B. COURVOISIER

**EFFET DU Ca^{2+} ET DU pH
SUR L'ACTIVITE FIBRINOLYTIQUE
DU GLOMERULE ISOLE DE REIN DE RAT**

THESE

présentée à la faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Edouard BLANC

de

AYENT (Valais)

Thèse No 3653

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545932_0012

**EFFET DU Ca^{2+} ET DU pH
SUR L'ACTIVITE FIBRINOLYTIQUE
DU GLOMERULE ISOLE DE REIN DE RAT**

THESE

présentée à la faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Edouard BLANC

de

AYENT (Valais)

Thèse No 3653

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1978

La faculté de médecine, sur le préavis du professeur Bernard Courvoisier, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 8 février 1978

Le vice-doyen :
Antoine Cuendet

Thèse No 3653



Au professeur Gabriel Richet, professeur à la faculté de médecine de Paris, qui m'a accueilli pendant 2 ans dans son service de néphrologie de l'Hôpital Tenon, et qui m'a permis de réaliser ce travail au sein de son équipe. En témoignage de ma reconnaissance et de ma très grande admiration.

A Jean-Daniel Sraer, qui m'a confié le sujet de cette thèse et qui a participé activement à sa réalisation. En témoignage de mon amitié.

Au professeur Raymond Ardaillou, pour ses conseils, ses critiques et sa bienveillance.

A Françoise Delarue, pour sa remarquable assistance technique.

A mes amis parisiens.

A MES PARENTS ET A MA FAMILLE

A MA FEMME ET A MA FILLE

A MES AMIS

INTRODUCTION

Les cellules glomérulaires possèdent une activité fibrinolytique due à la présence d'un activateur tissulaire du plasminogène (1, 2, 3). La libération de cette enzyme dans le milieu extracellulaire va déclencher une série de réactions enzymatiques qui permettra la lyse de la fibrine : activateur $\rightarrow$ plasminogène $\rightarrow$ plasmine $\rightarrow$ fibrine $\rightarrow$ produits de dégradation de la fibrine. Cette activité fibrinolytique glomérulaire, capable de varier dans certaines conditions expérimentales comme lors d'une perfusion de thrombine in vivo (4) ou de glomérulonéphrites sévères (5), a une grande importance en pathologie néphrologique. Dans un grand nombre de néphropathies humaines et expérimentales, on constate en effet la présence de dépôts de fibrine qui joue un rôle indéniable dans l'induction, l'amplification et le maintien des lésions glomérulaires (6, 7, 8, 9, 10). La persistance de ces thrombi au sein des glomérules est en grande partie la conséquence d'une défaillance du système fibrinolytique glomérulaire dont les mécanismes régulateurs ne sont pas encore connus.

Le but de ce travail est de définir "in vitro" 1) le rôle du Ca^{2+} et des nucléotides cycliques dans la libération de l'activateur glomérulaire du plasminogène, puisque leurs concentrations intracellulaires sont les principaux facteurs impliqués dans le mécanisme de sécrétion hormonale et enzymatique (11), 2) le rôle de la concentration des ions H^+ dans le milieu extracellulaire sur l'activité fibrinolytique.

I. Matériel et méthodes

Matériel

Les produits suivants ont été utilisés : adénosine diphosphate (ADP), AMP cyclique, GMP cyclique, dibutyryl AMP cyclique, dibutyryl GMP cyclique, épinéphrine, norépinéphrine et sérotonine de Sigma (St Louis, Mo, USA); fibrinogène humain dépourvu de plasminogène du Centre national de

Transfusion sanguine (Paris, France); plasminogène humain (15 unités/caséine/mg de protéine) de AB Kabi (Stockholm, Suède); thrombine (51 unités NIH/mg) de Hoffmann-La Roche (Bâle); fibrinogène humain I^{125} (0,1-0,3 mCi/mg) du Centre d'Etudes nucléaires (Saclay, France). L'angiotensine II et le Ionophore A 23187 ont été offerts respectivement par Ciba (Bâle) et E. Lilly & Co. (Indianapolis, In, USA). Tous les autres produits chimiques et solvants proviennent de Merck (Darmstadt, GFR) ou Sigma.

Méthode d'isolement des glomérules

En raison de sa structure particulière, il est possible de séparer le glomérule du reste du néphron, en le conservant dans son intégrité. Un grand nombre de procédés ont été décrits pour son isolement du cortex rénal, mais la méthode choisie dérive de celle de FONG et DRUMMOND (12). Des rats mâles Sprague-Dawley pesant entre 150 et 200 g sont anesthésiés par une injection intra-péritonéale de pentobarbital (5 mg/100 g de rat). Les deux reins sont prélevés, immédiatement déposés dans un tampon isotonique Tris-HCl 0,02 M, pH 7,5 à 0° C, contenant 0,135 M NaCl, 0,01 M KCl, 0,01 M NaCH_3COO et 0,005 M glucose (tampon A). La capsule du rein est retirée. Les reins sont disséqués sur une boîte de pétri refroidie, de façon à prélever uniquement le cortex. Ce dernier est broyé à l'aide d'une lame de rasoir jusqu'à l'obtention d'une purée de consistance pâteuse. Elle est étalée ensuite doucement à l'aide d'une spatule sur la surface d'un tamis métallique de maille 150 mesh (Tamisor). La face inférieure du tamis est grattée avec la spatule pour récupérer le maximum de broyat. Ce broyat est repris dans un tube contenant 10 ml de tampon A. La suspension obtenue est vigoureusement agitée et passée à travers une aiguille de calibre 25, cinq fois de suite. Elle est alors centrifugée à froid 90 secondes à 120 g. Le surnageant est aspiré délicatement et le culot remis en suspension dans le tampon A glacé. L'ensemble est repassé à travers l'aiguille et à nouveau centrifugé. Le procédé est renouvelé de 5 à 6 fois. Le culot final est repris dans un volume adéquat de tampon A. La pureté de la préparation est appréciée en examinant une goutte de la suspension au microscope à contraste de phase. Les préparations dont la pureté est inférieure à 95% de glomérules

sont éliminées. L'examen en microscopie électronique a été effectué pour apprécier la morphologie exacte des glomérules préparés. Ceux-ci ont conservés tous les caractères morphologiques normaux. L'endothélium capillaire est intact, la membrane basale visible; les podocytes des cellules épithéliales sont conservés. Les noyaux des cellules endothéliales et épithéliales sont bien vus et d'apparence normale ainsi que quelques cellules mésangiales.

Dosage par radio-essais de la fibrine lysée

Il s'agit d'une technique dérivée de celle décrite par MOROZ et GILMORE (13). Elle est basée sur la propriété des protéines à se fixer sur la paroi des tubes de polystyrène. Une solution de fibrinogène marqué à l'iode 125 est fixée à la paroi de ces tubes et transformée en fibrine par incubation avec de la thrombine.

(a) Préparation des tubes de fibrine radiomarquée

Une solution de fibrinogène humain (1 mg/ml) et de fibrinogène marqué à l'iode 125 (ajusté pour obtenir 750.000 cpm par tube), préparée en tampon phosphate 0,015 M, pH 8,2, est introduite dans des tubes de polystyrène (0,2 ml/tube). Ces tubes sont placés à 37° C pendant 180 min, pour permettre au fibrinogène de se fixer sur la paroi des tubes. Le fibrinogène non fixé est ensuite éliminé par trois lavages successifs avec 0,4 ml de tampon Tris-HCl 0,05 M pH 8,2, contenant 0,1 M NaCl (tampon B). 0,2 ml d'une solution de thrombine (10 U NIH/ml dans 0,16 M NaCl) sont ensuite ajoutés dans ces tubes que l'on incube à 37° C pendant 8 min. L'excédent de thrombine est aspiré, les tubes lavés trois fois avec du tampon B et soigneusement décantés. La radioactivité de chaque tube est ensuite comptée sur un compteur gamma (Searle), permettant une sélection des tubes en fonction de la quantité de fibrine fixée sur la paroi des tubes (18.000 $\pm$ 450 cpm). Ces tubes sont conservés à + 4° C jusqu'à leur utilisation, dans les 8 jours suivant leur préparation.

(b) Dosage de l'activité fibrinolytique glomérulaire

L'activité fibrinolytique est mesurée de la manière suivante : 60 μ l de suspension glomérulaire (0,50-0,75 mg/ml de protéine glomérulaire) ou de surnageant obtenu après centrifugation d'une préparation de glomérules isolés incubés pendant 30 min dans un milieu sans Ca^{2+} , sont introduits dans les tubes contenant la fibrine marquée à l'iode 125. 20 μ l d'une solution de plasminogène (2,5 unités caséine/ml de tampon A) et 20 μ l d'eau avec ou sans le cation ou l'agent testé sont ajoutés. Ces tubes sont incubés à 37° C sous agitation continue et la réaction enzymatique est arrêtée par adjonction d'1 ml de tampon B glacé. La totalité du contenu de chaque tube est aspirée et mise dans des tubes propres. La radioactivité libérée est alors comptée sur compteur gamma. L'activité fibrinolytique glomérulaire est exprimée en μ g de fibrine lysée soit par mg de protéine glomérulaire, soit par tube, tandis que l'activité fibrinolytique du surnageant n'est exprimée qu'en μ g de fibrine lysée par tube.

Des tubes ne contenant pas de plasminogène, remplacé par 20 μ l de tampon A, sont également préparés. Ils sont appelés "blanc-glomérule" ou (BG). La quantité de fibrine lysée dans ces tubes représente l'ensemble des divers processus de dégradation de la fibrine non médiée par le plasminogène : plasmine et autres enzymes protéolytiques présentes dans la préparation glomérulaire (en moyenne 12% de la fibrine fixée). Cette quantité de fibrine lysée est déduite de la quantité de fibrine lysée dans les tubes contenant le plasminogène. La différence obtenue est considérée comme représentant l'activité fibrinolytique médiée par l'activateur glomérulaire du plasminogène.

La dégradation spontanée de la fibrine a été mesurée pour chaque série de dosage. Des tubes ne contenant pas de glomérules, appelés "blanc-plasminogène" ou (BP), remplacés par 60 μ l de tampon A, sont soumis aux mêmes manipulations que ceux contenant des glomérules. La quantité de fibrine lysée spontanément est constante et représente moins de 5% de la fibrine totale fixée.

II. Résultats

1. Effets du Ca^{2+} sur l'activité fibrinolytique glomérulaire à pH 7,5

La figure 1. montre que la quantité de fibrine lysée par mg de protéines glomérulaires augmente linéairement en fonction du temps d'incubation, soit en l'absence de Ca^{2+} dans le milieu, soit en présence de 1 mM de Ca^{2+} . Les deux droites de régression, comparées par analyse de variance, montrent que



Fig. 1. Quantité de fibrine lysée en fonction du temps d'incubation, avec 1 mM de CaCl_2 (cercles fermés) et sans CaCl_2 (cercles ouverts). Chaque point représente la moyenne de 3 déterminations et chaque barre verticale l'écart type de la moyenne. Les 2 droites de régression sont tracées.

l'addition de Ca^{2+} raccourcit significativement ($p < 0,01$) le temps de latence nécessaire pour détecter l'activité fibrinolytique (interceptions avec l'abscisse) et augmente l'importance de la fibrinolyse (pentes). Il est extrêmement difficile dans nos conditions expérimentales de déterminer avec plus de précision le temps de latence et c'est par extrapolation que l'on obtient ces deux valeurs (27 min sans Ca^{2+} et 17 min avec Ca^{2+}).

La figure 2. montre que l'activité fibrinolytique glomérulaire augmente linéairement en fonction de la concentration des protéines glomérulaires par tube avec et sans adjonction de 1 mM de Ca^{2+} . L'interception avec l'abscisse des deux droites est identique alors que la pente est nettement plus grande en présence de 1 mM de Ca^{2+} . Ces résultats nous permettent d'exprimer l'activité fibrinolytique par mg de protéines glomérulaires, ceci entre 0 et 120 μg de protéines glomérulaires par tube. L'activité fibrinolytique glomérulaire a été mesurée en fonction de la concentration du plasminogène, le plasminogène étant le substrat de la réaction enzymatique (fig. 3). La rapidité de la réaction est plus grande en présence de 1 mM de Ca^{2+} pour l'ensemble des concentrations de plasminogène étudiées. Les deux courbes ont été linéarisées selon la transformation en simple réciproque d'Eadie. Les affinités de l'enzyme pour son substrat (K_m) ne sont pas statistiquement différentes ($p > 0,05$) tandis que la vitesse maximale en présence de Ca^{2+} est nettement plus grande ($p < 0,01$).

Afin d'étudier l'effet du Ca^{2+} , l'activité fibrinolytique a été mesurée en fonction de concentrations croissantes de Ca^{2+} , en deux expériences parallèles (fig. 4). En présence de glomérules isolés (graphique de gauche), on obtient une courbe sigmoïde en fonction de la dose de Ca^{2+} . La concentration de Ca^{2+} correspondant à 50% de la stimulation maximale est de 5×10^{-5} M. Un plateau est observé à des concentrations de Ca^{2+} supérieures à 5×10^{-4} M. En présence de surnageant obtenu après centrifugation d'une préparation de glomérules isolés pré-incubés pendant 30 min dans un milieu dépourvu de Ca^{2+} (graphique de droite), on observe aucune modification de l'activité fibrinolytique pour des concentrations de Ca^{2+} inférieures à 10^{-4} M. Au-dessus de cette dose, il y a une légère inhibition de la réaction enzymatique.

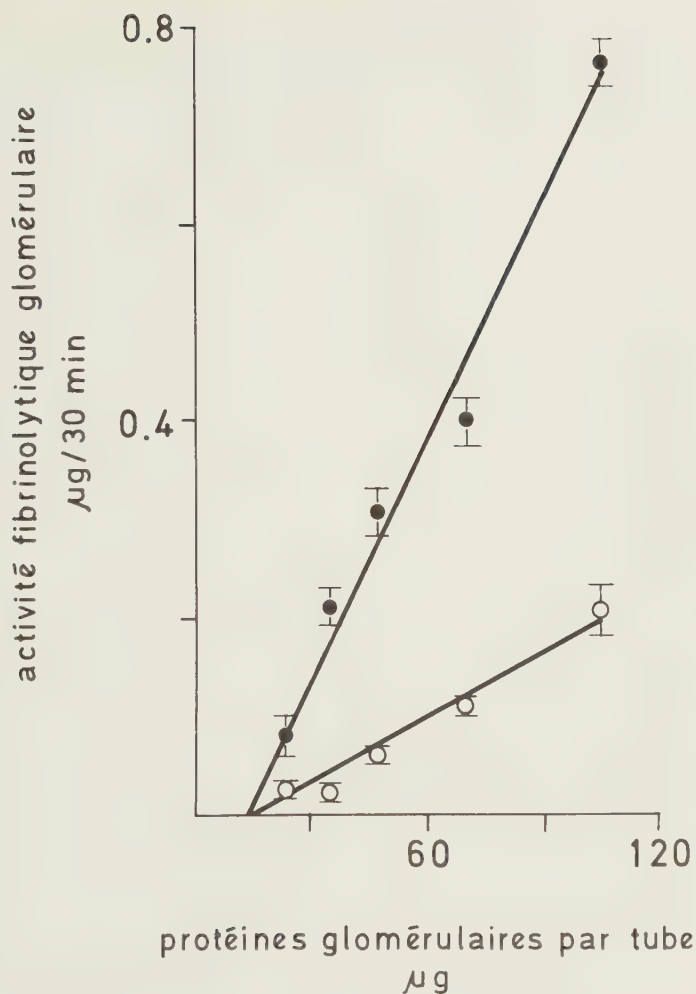


Fig. 2. Activité fibrinolytique glomérulaire en fonction de la quantité de protéines glomérulaires par tube avec 1 mM de CaCl_2 (cercles fermés) et sans Ca^{2+} (cercles ouverts). Chaque point représente la moyenne de 3 déterminations et chaque barre verticale l'écart type de la moyenne. Les 2 droites sont les résultats de la régression linéaire.

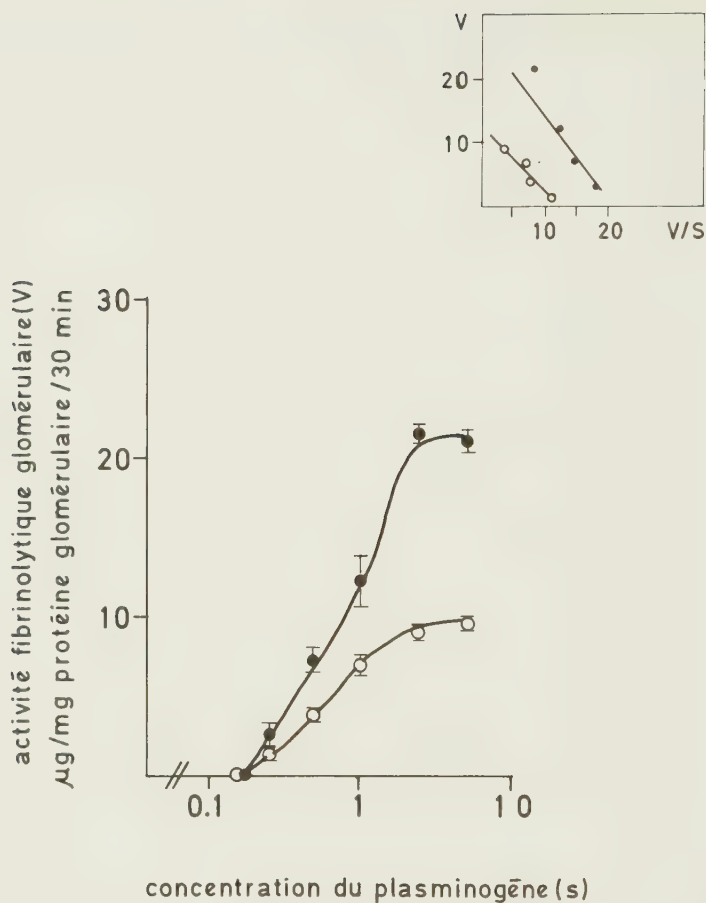


Fig. 3. Activité fibrinolytique glomérulaire (V) en fonction de la concentration de plasminogène (S) avec 1 mM de CaCl_2 (cercles fermés) et sans Ca^{2+} (cercles ouverts). Les abscisses sont données en échelle logarithmique. Chaque point représente la moyenne de 3 déterminations et chaque barre verticale l'écart type de la moyenne. La représentation graphique en simple réciproque selon Eadie est montrée en encadré.

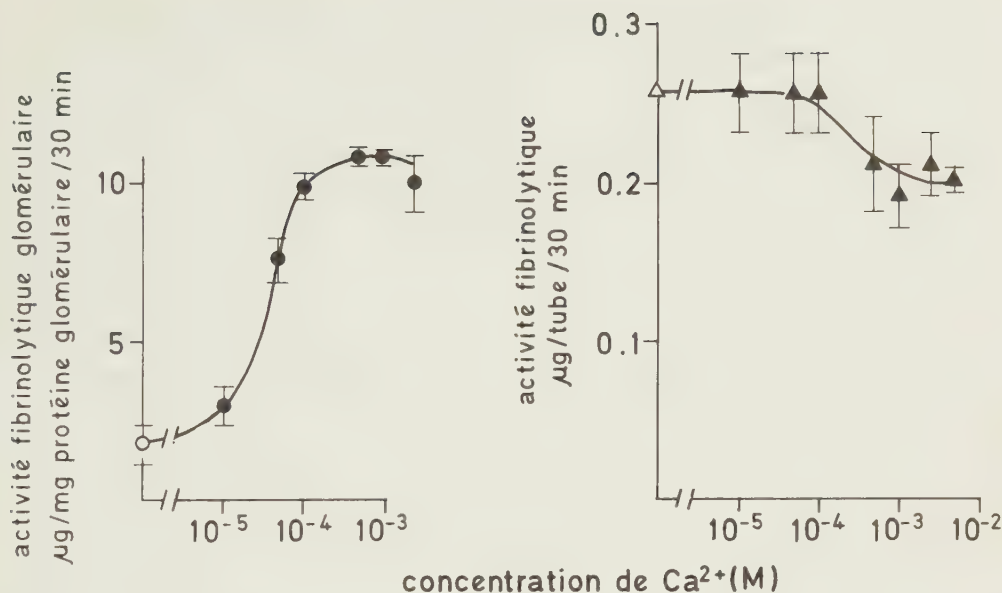


Fig. 4. Effets du Ca^{2+} sur l'activité fibrinolytique en présence de glomérules isolés (graphique de gauche), ou de surnageant obtenu après centrifugation d'une préparation de glomérules isolés incubée pendant 30 min (graphique de droite). Chaque point représente la moyenne de 3 déterminations et chaque barre verticale l'écart type de la moyenne. Les abscisses sont données en échelle logarithmique.

2. Effet du pH sur l'activité fibrinolytique glomérulaire et interaction du pH avec le Ca^{2+}

Il y a un effet tout à fait net du pH sur l'activité fibrinolytique glomérulaire en présence d'une concentration constante de Ca^{2+} (1 mM dans le milieu) (fig. 5). L'activité fibrinolytique glomérulaire augmente progressivement à partir d'un pH 7,0 pour atteindre un plateau entre le pH 8,2 et 9,0. L'activité fibrinolytique glomérulaire a aussi été étudiée en fonction du temps à 3 pH différents (fig. 6). Une analyse de variance portant sur deux facteurs (pH et temps) confirme l'interaction significative ($p < 0,01$) entre le pH et le temps puisque l'effet du pH n'est évident qu'après 30 min d'incubation. La rapidité de la réaction enzymatique a été mesurée en fonction

de la concentration du substrat (le plasminogène) et à 3 pH différents (fig. 7). Les courbes obtenues à pH 7,0, 7,5 et 8,2 ont été linéarisées selon la transformation en simple réciproque d'Eadie. Il n'y a pas de différence significative entre les K_m tandis que la vitesse maximum augmente clairement avec le pH. L'interaction entre le pH et l'effet du Ca^{2+} a aussi été étudiée. la figure 8 montre que l'activité fibrinolytique la plus grande est obtenue avec le pH le plus élevé pour toutes les concentrations de Ca^{2+} testées et qu'il y a une corrélation directe entre le pH et l'activité fibrinolytique. En présence de glomérules isolés, l'augmentation de l'activité fibrinolytique en fonction de la concentration de Ca^{2+} est observée aux 3 pH considérés.

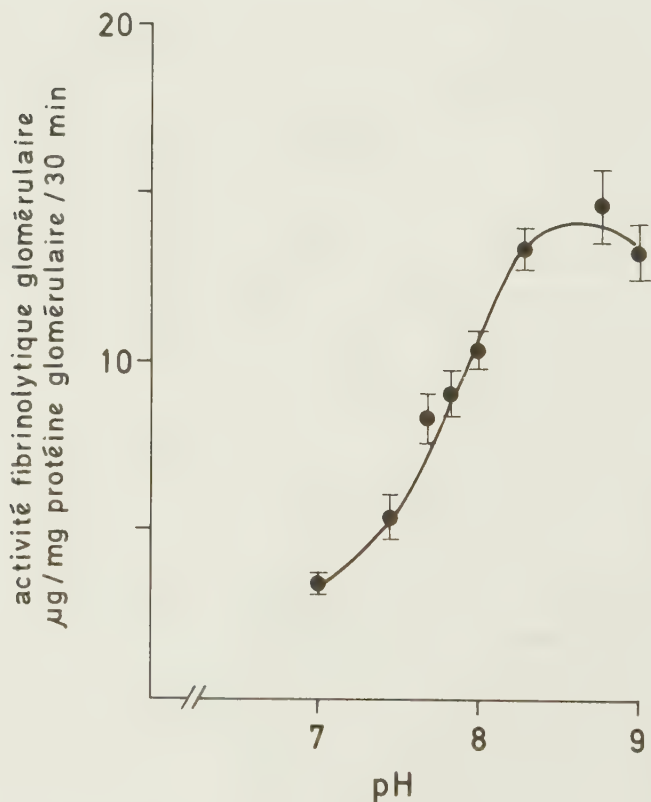


Fig. 5. Activité fibrinolytique glomérulaire en fonction du pH, en présence de 1 mM de $CaCl_2$. Chaque point représente la moyenne de 3 déterminations et chaque barre verticale l'écart type de la moyenne.

On obtient trois courbes sigmoïdes et il y a une corrélation directe entre le pH et le plateau de la courbe. Toutefois, les effets du Ca^{2+} et du pH ne sont pas additifs, comme le montre l'absence de parallélisme entre les courbes. Ceci est confirmé par une analyse de variance portant sur deux facteurs (le pH et le Ca^{2+}) qui montre l'existence d'une interaction significative ($p < 0,01$) entre le pH et la concentration de Ca^{2+} . En présence de surnageant obtenu après centrifugation d'une préparation glomérulaire pré-incubée pendant 30 min dans un milieu dépourvu de Ca^{2+} , l'activité fibrinolytique diminue en fonction de concentrations croissantes de Ca^{2+} , quel que soit le pH considéré. Les trois courbes correspondant aux trois pH sont parallèles, ce qui suggère un effet additif du pH et du Ca^{2+} . Ceci est confirmé par une analyse de variance portant sur deux facteurs (pH et Ca^{2+}) qui montre l'absence d'interaction significative ($p > 0,05$) entre le pH et le Ca^{2+} .

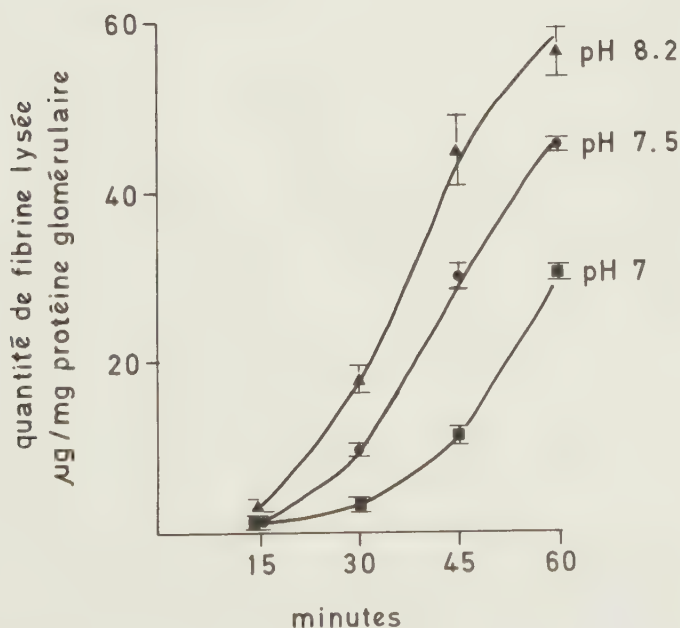


Fig. 6. Activité fibrinolytique glomérulaire en fonction du temps d'incubation, à 3 pH considérés en présence de 1 mM de CaCl_2 . Chaque point représente la moyenne de 3 déterminations et chaque barre verticale l'écart type de la moyenne.

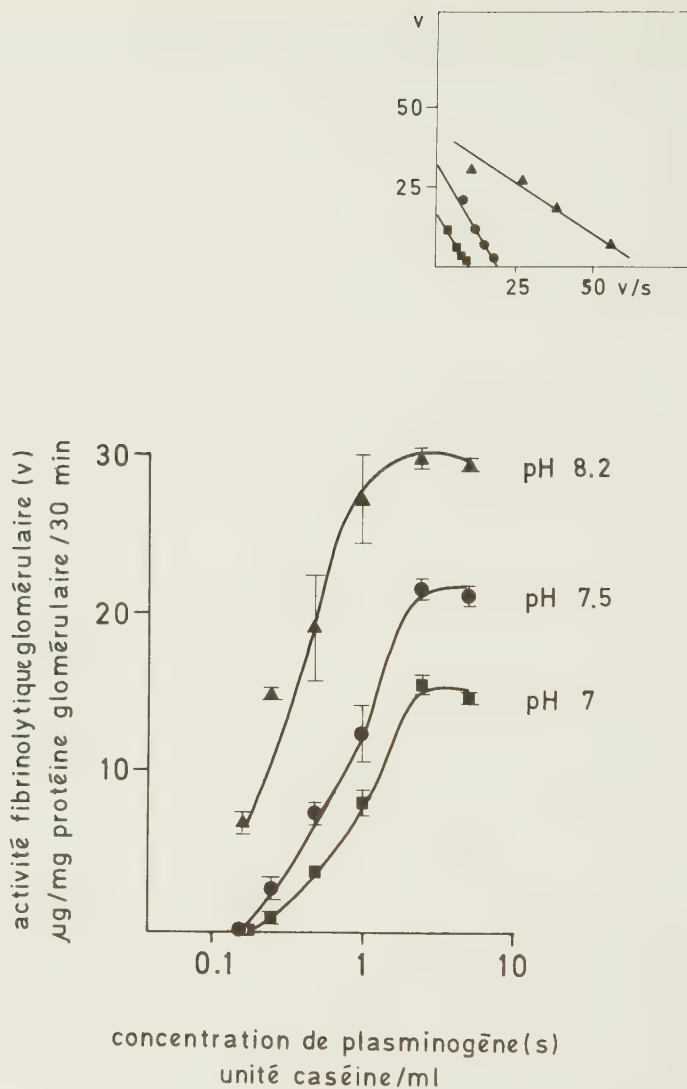


Fig. 7. Activité fibrinolytique glomérulaire (V) en fonction de la concentration de plasminogène (S) à 3 pH considérés en présence de 1 mM de CaCl_2 . Les abscisses sont données en échelle logarithmique. Chaque point représente la moyenne de 3 déterminations et chaque barre verticale l'écart type de la moyenne. La représentation graphique en simple réciproque selon Eadie est montrée en encadré.

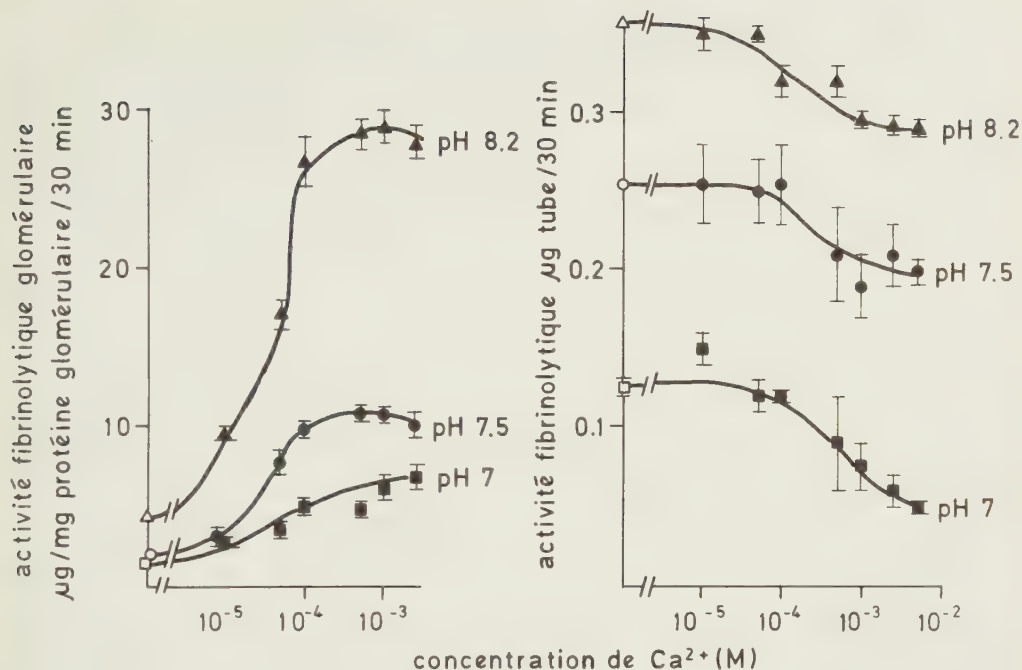


Fig. 8. Effets du Ca^{2+} à 3 pH différents sur l'activité fibrinolytique en présence de glomérules isolés (graphique de gauche) ou de surnageant obtenu après centrifugation d'une préparation de glomérules isolés incubés pendant 30 min (graphique de droite). Chaque point représente la moyenne de 3 déterminations et chaque barre verticale l'écart type de la moyenne. Les abscisses sont données en échelle logarithmique.

3. Effets des autres substances étudiées sur l'activité fibrinolytique glomérulaire

Le Mg^{2+} et le Mn^{2+} aux mêmes concentrations que le Ca^{2+} n'ont aucun effet sur les deux phases de la réaction, tandis que le La^{3+} a une action inhibitrice sur les deux phases lorsque la concentration est supérieure à 10^{-5} M. Le Ionophore A23187 à 10^{-6} M n'a aucun effet. Les nucléotides cycliques testés à des concentrations allant de 10^{-6} à 10^{-3} M sont inactifs. Trois hormones vasoactives, l'angiotensine II (10^{-11} - 10^{-8} M), l'épinéphrine et la norépinéphrine (10^{-8} - 10^{-5}) ont aussi été étudiées. Aucune modification de l'activité fibrinolytique glomérulaire n'a été observée. L'ADP et la

sérotonine à 10^{-8} - 10^{-5} M sont inactives. Les glomérules isolés ont été pré-incubés dans le tampon A contenant 10^{-3} M de Ca^{2+} et 0,2% de triton X100 pendant 30 min. Après centrifugation l'activité fibrinolytique du surnageant a été mesurée. Dans ces conditions, l'activité fibrinolytique glomérulaire atteint 4 fois l'activité maximale observée en présence de Ca^{2+} et de glomérules isolés.

DISCUSSION

La fibrinolyse glomérulaire comporte deux phases essentielles :

1) la libération de l'activateur du plasminogène des cellules glomérulaires dans le milieu extracellulaire; 2) la réaction enzymatique elle-même incluant la conversion du plasminogène en plasmine et la formation des produits de dégradation de la fibrine (fig. 9). L'activité fibrinolytique glomérulaire a été quantifiée dans cette étude par une technique dérivée de celle de MOROZ et GILMORE (13) qui, par rapport à la technique de la plaque de fibrine utilisée jusqu'à maintenant (3, 14, 15), a l'avantage de permettre l'analyse des deux étapes de la réaction et d'évaluer l'activité fibrinolytique non médiée par le plasminogène. Quand les glomérules isolés sont présents, les effets observés peuvent être la conséquence d'une modification portant sur la libération de l'enzyme seule, ou sur la libération et la séquence enzymatique. Au contraire, lorsque le surnageant obtenu après centrifugation d'une préparation glomérulaire préalablement incubée à 37°C est introduit dans les tubes à radio-essai, la réaction se fait en présence d'une certaine quantité d'activateur glomérulaire du plasminogène qui ne peut être modifiée pendant le temps d'incubation étant donné l'absence des cellules glomérulaires. Dans cette situation, seule la phase enzymatique aboutissant à la lyse de la fibrine est étudiée.

Nos résultats montrent clairement que le Ca^{2+} , en concentration physiologique dans les liquides extracellulaires, joue un rôle majeur dans le contrôle de la libération de l'activateur glomérulaire du plasminogène. Lorsque les glomérules isolés sont absents du milieu d'incubation et qu'il n'y a qu'une certaine quantité d'activateur, le Ca^{2+} ne modifie pas l'activité fibrinolytique, ou inhibe légèrement la formation de produits de dégradation

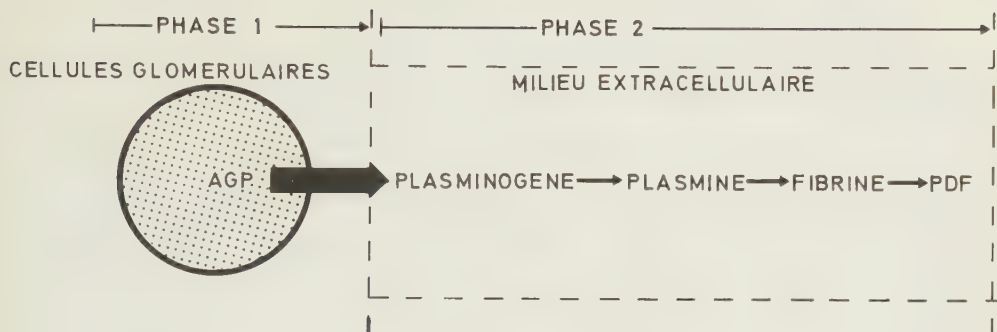


Fig. 9. Schéma du mécanisme de la fibrinolyse glomérulaire.

Phase 1 : libération de l'activateur du plasminogène des cellules glomérulaires (AGP).

Phase 2 : séquence enzymatique aboutissant à la formation des produits de dégradation de la fibrine (PDF).

de la fibrine. Ainsi, la stimulation marquée de l'activité fibrinolytique glomérulaire qui est observée après addition de Ca^{2+} en présence de glomérules isolés ne peut être attribuée qu'à une augmentation de la libération de l'activateur glomérulaire du plasminogène. Ceci démontre que le Ca^{2+} agit essentiellement sur la première phase de la réaction. Le Ca^{2+} extracellulaire raccourcit le temps de latence nécessaire pour détecter l'activité fibrinolytique et augmente la quantité de fibrine lysée, ce qui peut être interprété comme la conséquence d'une meilleure disponibilité des réserves enzymatiques intracellulaires ou d'une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire à l'enzyme. L'absence d'effet du Ionophore A23187 pourrait être un argument en faveur de la seconde hypothèse. Un rôle éventuel du Ca^{2+} sur la synthèse de l'activateur glomérulaire du plasminogène semble improbable pour deux raisons : 1) l'augmentation de l'activité fibrinolytique induite par le Ca^{2+} est très rapide et 2) les réserves intracellulaires de l'enzyme sont largement suffisantes. L'importance de ces réserves déjà établies antérieurement dans le cortex rénal de lapin (16) a pu être confirmée au cours de cette étude dans les glomérules isolés de rein de rat. En effet, la pré-incubation de glomérules avec du triton X100 qui solubilise les composants des membranes permet d'augmenter considérablement l'activité fibrinolytique glomérulaire. CHOU et coll. (17) ont montré récemment que la production d'activateur du plasminogène par

les cellules cultivées de souris était stimulée par le Ca^{2+} et ont attribué ce résultat à un effet mitogène du Ca^{2+} . Nos conditions expérimentales ne permettent pas de retenir cette hypothèse.

Le pH a une action tout à fait nette sur l'activité fibrinolytique glomérulaire en présence d'une concentration constante de Ca^{2+} (fig. 5) et la quantité de fibrine lysée est beaucoup plus importante à un pH alcalin compris entre 8,2 et 8,6. Des résultats similaires ont été observés par ALI et LACK (16) avec des fractions de cortex rénal de lapin riches en lysosomes. Contrairement au Ca^{2+} , le pH modifie la réaction enzymatique elle-même. Dans ce cas, l'effet du pH est indépendant de celui du Ca^{2+} puisque l'analyse de variance ne montre pas d'interaction significative entre ces deux facteurs en l'absence de glomérules. Les effets combinés du pH et du Ca^{2+} sur la libération de l'activateur glomérulaire du plasminogène (phase 1) sont plus difficiles à évaluer. Puisque l'analyse de variance montre une interaction significative entre ces deux facteurs en présence de glomérules isolés, il est probable que le pH modifie l'effet du Ca^{2+} sur la première étape de la réaction, cet effet étant plus net à un pH plus élevé (fig. 8).

La fibrinolyse est la conséquence d'une coagulation intravasculaire et le signal produisant la libération de l'activateur tissulaire du plasminogène devrait être en relation avec l'un des facteurs impliqués dans le processus de coagulation intravasculaire. Les produits que nous avons testés, en particulier ceux relâchés par les plaquettes (ADP et sérotonine) n'ont eu aucune action sur l'activité fibrinolytique in vitro. Les hormones vasoactives, comme l'épinéphrine, la norépinéphrine et surtout l'angiotensine II qui possède des récepteurs glomérulaires (18, 19), n'ont pas eu non plus d'influence sur la fibrinolyse glomérulaire. Puisque l'activité fibrinolytique est nettement dépendante du pH, qu'elle est faible à pH 7,0 et pratiquement inexistante à pH plus acide, il est possible que l'acidose observée dans certains cas d'insuffisance rénale aiguë avec coagulation intravasculaire soit l'un des facteurs responsables de la nécrose corticale partielle ou totale. D'autres conditions cliniques dans lesquelles il peut exister un phénomène d'acidose intrarénale ne sont certainement pas exceptionnelles et cette acidose localisée pourrait être un des facteurs favorisant la persistance des thrombi si fréquemment rencontrés au cours des néphropathies glomérulaires.

RESUME

L'activité fibrinolytique de glomérules de rein de rat a été mesurée en utilisant une technique qui permet d'étudier les deux phases successives de la réaction : la libération de l'activateur du plasminogène des cellules en présence de glomérules isolés et la séquence enzymatique elle-même en présence de surnageant obtenu après centrifugation d'une préparation glomérulaire pré-incubée pendant 30 min. Le Ca^{2+} raccourcit le temps de latence nécessaire pour détecter l'activité fibrinolytique et augmente la libération de la l'activateur glomérulaire du plasminogène. L'activité fibrinolytique glomérulaire a aussi été mesurée en fonction de la concentration du plasminogène. Le Ca^{2+} à la concentration de 1 mM augmente nettement la vitesse maximum de l'enzyme, mais ne change pas l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Au contraire, le Ca^{2+} ne modifie pas ou inhibe légèrement la réaction enzymatique elle-même au-dessus de 0,5 mM. L'activité fibrinolytique mesurée en présence de glomérules est nettement dépendante du pH et maximale à pH 8,2. Dans ces conditions, il y a une interaction évidente entre le pH et le Ca^{2+} . Cette interaction n'est pas observée quand les glomérules sont absents du milieu d'incubation et qu'il n'existe que l'activateur du plasminogène. Ces résultats démontrent clairement le rôle majeur joué par le Ca^{2+} dans le contrôle de la libération de l'activateur glomérulaire du plasminogène et l'importance du pH sur l'activité fibrinolytique.

References

1. McCONNELL D., JOHNSON J.G., YOUNG I., and HOLEMANS R. Localization of plasminogen activator in kidney tissue. Lab. Invest. 15, 780, 1966.
2. MYRHE-JENSEN O. Localization of fibrinolytic activity in the kidney and urinary tract of rats and rabbits. Lab. Invest. 25, 403-411, 1971.
3. SRAER J.D., BOELAERT J., MIMOUNE O., MOREL-MAROGER L., and HORNYCH H. Quantitative assessment of fibrinolysis on isolated glomeruli. Kidney Int. 4, 350-352, 1973.
4. SRAER J.D., DELARUE F., DARD S., LeSEIGNEUX R., MOREL-MAROGER L., and KANFER A. Glomerular fibrinolytic activity after thrombin perfusion in the rat. Lab. Invest. 32, 515-517, 1975.
5. GIROUD L., VERROUST P.J., SRAER J.D., DELARUE F., DELAUCHE M., and MOREL-MAROGER L. Glomerular fibrinolytic activity during nephrotoxic nephritis. Soumis pour publication.
6. VASSALLI P., SIMON G., et ROUILLER C. Electron microscopic study of glomerular lesions resulting from intravascular fibrin formation. Am. J. Pathol. 43, 576-617, 1963.
7. VASSALLI P., et McCLUSKEY R.T. Rôle de la coagulation dans les affections glomérulaires d'origine immunologique. Act. Nephrol. Hôp. Necker 1971, Paris, Flammarion, 55-72, 1971.
8. KINLAID-SMITH P. Coagulation and renal disease. Kidney Int. 2, 183, 1972.
9. WARDLE E.N. Fibrin in renal disease : functional considerations. Clin. Nephrol. 2, 85, 1974.
10. HEPTINSTALL R.H. Rapidly progressive glomerulonephritis. In Pathology of the Kidney, 2ème éd., vol. 1, Boston, Little Brown, 371-391, 1974.

11. BERRIDGE M.J. The interaction of cyclic nucleotides and calcium in the control of cellular activity. In *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, éd. par P. Greengard et G.A. Robison, vol. 6, New York, Raven Press, 1-98, 1975.
12. FONG S.J.C., DRUMMOND K.N. Method for preparation of isolated glomeruli for metabolic studies. *J. Lab. clin. Med.* 71, 1034-1039, 1968.
13. MOROZ L.A., GILMORE N.J. A rapid and sensitive ^{125}I -fibrin solid-phase fibrinolytic assay for plasmin. *Blood* 46, 543-553, 1975.
14. KWAAN H.C., ASTRUP T. Demonstration of cellular fibrinolytic activity by the histochemical fibrin slide technique. *Lab. Invest.* 17, 140-145, 1967.
15. PANDOLFI M., BJERNSTAD A., NILSSON I.M. Technical remarks on the microscopical demonstration of tissue plasminogen activator. *Throm. Diath. Haemorrh.* 27, 88-98, 1972.
16. ALI S.Y., LACK C.H. Studies on the tissue activator of plasminogen. Distribution of activator and proteolytic activity in the subcellular fraction of rabbit kidney. *Biochem. J.* 96, 63-74, 1965.
17. CHOU I.N., ROBLIN R.O., BLACK P.H. Calcium stimulation of plasminogen activator secretion/production by Swin 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 252, 6256-6259, 1977.
18. SRAER J.D., SRAER J., ARDAILLOU R., MIMOUNE O. Evidence for renal glomerular receptors for angiotensin II. *Kidney Int.* 6, 241-246, 1974.
19. SRAER J., BAUD L., COSYNS J.P., VERROUST P., NIVEZ M.P., and ARDAILLOU R. High affinity binding of ^{125}I -Angiotensin II to rat glomerular basement membranes. *J. Clin. Invest.* 59, 69-81, 1977.

